云 南 植 物 研 究 1988; 10 (4): 373—380
Acta Botanica Yunnanica

天麻球茎中一种抗真菌蛋白的分离和部分特性

胡 忠 杨增明
(中国科学院昆明植物研究所，昆明)

王 钧
(中国科学院上海植物生理研究所，上海)

摘要 自天麻（*Gastrodia elata*）顶生球茎中分离并纯化了一种抗真菌蛋白（Gastrodia Antifungal Protein），简称GAFP。在马铃薯葡糖琼脂培养基上，4 μg GAFP滴加在直径0.6 cm圆纸片上可明显抑制木霉（*Trichoderma reesei*）菌丝生长。从每千克鲜球茎中可分离得GAFP约20 mg。用SDS-PAGE和凝胶过滤层析测得该蛋白为单多肽链，分子量14.0kD；用离子交换结合法测得电点为8.1；富含Asn，Ala，Gly和Leu，但无Met，Cys和Pro。未经热变性或SDS处理的GAFP与考马氏亮蓝试剂不发生显色反应。GAFP不具有几丁质酶和β-1,3-葡聚糖酶活性。球茎外层组织富含这种蛋白，内层薄壁组织无此蛋白。认为GAFP在阻止真菌侵染当年生顶生和侧生球茎的防卫机制中起重要作用。

关键词 天麻；抗真菌蛋白

天麻（*Gastrodia elata* Bl.）系兰科植物，不含叶绿素，其球茎依靠从侵染入的密环菌（*Armillariella mellea*）菌丝取得营养物而生长发育。然而，形态学观察已证明[1]，真菌不能侵染当年生的顶生和侧生球茎；在被密环菌正常侵染的头年生球茎中，菌丝严格地被阻止在皮层区并在该处被消化。这表明，天麻球茎既有赖于真菌的侵染，又具有强有力的阻止或限制真菌侵染的防卫机制。有关这种机制的生物化学基础，文献中尚未见报道。我们发现，茎球外层组织富含一种能强烈抑制真菌生长的蛋白，称为天麻抗真菌蛋白（Gastrodia Antifungal Protein，简称GAFP），这种蛋白可能在防卫机制中起重要作用。本文报告这种蛋白的分离纯化方法和部分特性。

材 料 和 方 法

1.材料

供提取蛋白的材料是人工栽培的红天麻（*G. elata* f. *elata*）当年生顶生新鲜球茎，每个球茎重10—80克不等。采取后立即使用，若在8 °C左右存放，时间不超过五天。

2.蛋白质的提取和纯化

将鲜球茎外表用水洗净，切成0.5 cm见方小块或薄片，置组织捣碎器中，加入1

1988-03-22收稿

—2倍重量、在4°C预冷的氯化钠溶液（0.2 mol/l，pH 6.0），高速匀浆提取10 min。匀浆液经纱布过滤，残渣再按上法提取一次，合并滤液，于$10^4 \times g$冷冻离心15 min，去沉淀。在上清液中搅拌加入硫酸铵，使硫酸铵浓度达70%饱和度，置4°C 20 min，离心，弃去上清液，沉淀用适量0.05 mol/l磷酸钠盐缓冲液（pH 6.0）溶解，离心去沉淀，得到总的可溶性蛋白溶液（T）。将蛋白溶液上Sephadex G 50柱作凝胶过滤层析，用0.05mol/l磷酸钠盐缓冲液（pH 6.0）平衡并洗脱，280 nm波长检测，得三个洗脱峰，收集峰2组分（G 2）。将该组分通过经0.05 mol/l 缓冲液（pH 6.5）平衡的Deae-Sephadex A25柱，流出液（组分D 2）加在同上缓冲液平衡的CM-cellulose柱上，用0—0.2 mol/l 的氯化钠溶液（pH 6.5）线性梯度洗脱，收集洗脱峰2（组分C 2）。将该组分用PM 5超滤膜超滤脱盐和浓缩，冻干成蛋白干粉。

3.抗真菌活性检测

参照Roberts等人方法[2]，用木霉(*Trichoderma reesei*)作指示菌。在直径9 cm培养皿中加马铃薯葡糖琼脂培养基（PGA）8 ml，将木霉菌丝或孢子接种于培养皿中心，置25°C培养，待菌丝向外蔓延的圆面直径约3 cm时，取滴加有一定量待测化合物的无菌滤纸圆片（Whatman No. 3，直径0.6 cm），平放在菌丝伸展前方约1 cm处，置20—25°C培养8—24小时。加有抗菌活性物质的纸片周围出现抑菌圈。本文试验中定性检测时，每一纸片滴加蛋白量50 μg。

密环菌在PGA培养时一般形成生长缓慢的菌索，不适于作检测菌。我们将表面灭菌处理过的天麻球茎横切圆片置于PGA培养基上培养，从圆片内长出絮状菌丝。GAFP对这种菌丝的生长显示抑制作用，但这是否肯定是密环菌则未作鉴定。

4.蛋白质理化性质的测定

按常规SDS-聚丙烯酰胺电泳测定蛋白质的分子量，胶浓度15%，Laemmli缓冲系统[3]。不加变性剂的凝胶电泳参照Reisfeld等人方法[4]，但为使GAFP染色，在染色液中加SDS。同时，用Sephadex G50（fine）凝胶过滤层析法测未经变性处理的蛋白质分子量，胶柱用pH 6.5，0.1 mol/l 的磷酸钠盐缓冲液平衡和洗脱。

等电点的测定参考Yang and Langer（1985）[5]的离子交换结合法。配制一系列不同pH值的0.1 mol/l Tris-HCl缓冲液，用pH计测定pH值，各取0.8 ml于一系列1.5 ml的离心管中，各加入等量体积经充分吸胀的SP-Sephadex C50胶，混合10 min，2000 ×g 离心3 min，吸去上清液，再各加1 ml 0.05 mol/l的各种不合缓冲液，同上处理二次。另取GAFP干粉用上述不同pH缓冲液（0.05 mol/l）配成一系列pH的蛋白质溶液，浓度均为0.5 mg/ml。将蛋白溶液与相应pH平衡过的胶混合，摇匀20 min，离心，取各管上清液用微量池测定280 nm的吸收值A。作A值与pH相关曲线，用统计法求得线性区域中点的pH值，为等电点（图5）。

用岛津UV-260分光光度计测定GAFP的紫外光谱（pH 7.0），根据蛋白浓度和分子量计算出$E_{278}^{1\%}$nm和ε值。蛋白质氨基酸组成分析按常规法，在6N HCl中于110°C水解24 h，用日立835型氨基酸自动分析仪测定。色氨酸的测定法按照Goodwin等人（1946）[6]，测定蛋白质在0.1*N* NaOH溶液中A280 nm和A294.4 nm，计算出其在蛋白质中的含量。

蛋白质与考马氏亮蓝显色反应参照 Bradford[7] 方法。显色反应前蛋白质预处理方法见图 6。

5. 几丁质酶和β-1,3-葡聚糖酶活性测定

几丁质（chitin）干粉按Lingappa等人方法[8]制成胶态，按 Abeles 等人方法[9]测定蛋白质的exo-chitinase活性，反应液体积 2 ml，含几丁质 1 mg，蛋白 1 mg，50 mmol/l 柠檬酸缓冲液（pH 5.0），37°C振盪反应4 h，离心后测上清液中 N-乙酰葡糖胺量，计算酶活性。

β-1,3-Glucanase活性测定参照Boucaud等（1987）方法[10]，反应液0.1 ml，内含蛋白0.1 mg，昆布多糖（laminarin）0.1 mg，50 mmol/l Na-acetate 缓冲液（pH 5.2），40°C反应3 h，立即按照 Somogyi（1952）[11]方法测定反应产生的葡糖量，计算酶活性。

结　果　与　讨　论

1. 抗真菌蛋白的分离和活性测定

天麻球茎的稀盐提取液经硫酸铵沉淀所得水溶性总蛋白（T）显示有抗真菌活性（图 1，T）总蛋白通过Sephadex G50得到三个组分（图 2），其中G 1 组分抗菌活性很弱，G 3 组分是酚性化合物，无抗菌活性，只有G 2 有强的抗菌活性（图 1，G 2）。将G 2 通过Deae-Sephadex柱，酸性蛋白被结合于柱上（D 2），无抗菌活性，流出组分D 1 包括全部抗菌活性（图 1，D 1）。经 CM-cellulose 柱层析分离所得主要组分 C 2 便是纯化的抗真菌蛋白（图 3，图 1、C 2）。各组分蛋白的得率见表 1。自 1 kg 鲜天麻球茎平均可得GAFP约20 mg。由表 1， GAFP 是天麻球茎可溶性蛋白中一个主要成分，占15%以上。

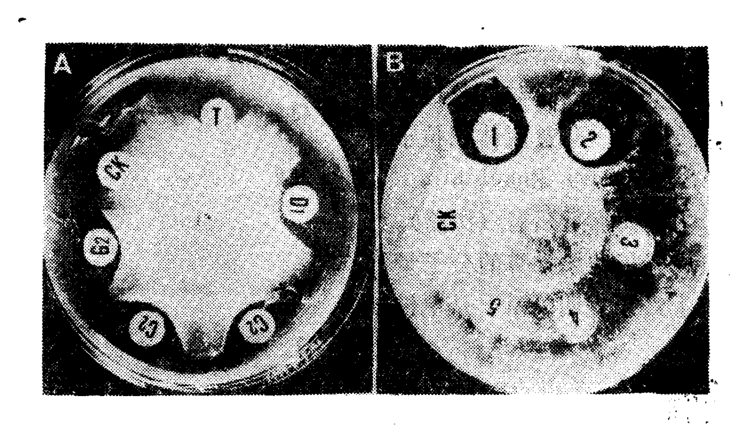


图 1　天麻球茎蛋白对木霉菌丝生长的抑制作用

Fig. 1　Antifungal activity of proteins from *G. elata* corm, as inhibiting mycelial spread of *Trichoderma reesei*. Panel A, different fractions of protein in purification procedure, see Fig 2, 3 and text, on each disc was loaded 50 μg of protein except 20 μg on one C2. Panel B, different quantity of the antifungal protein(C2) on a disc, for 1, 2, 3, 4, 5 was loaded 50, 20, 4, 0.8, 0.2 μg respectively.

GAFP的得率因球茎大小而异，大天麻球茎得率偏低，主要原因是GAFP 只含于球茎的外层组织。由表 1，重量相等的外层（皮部）和内层（心部）总蛋白量，内层只有外层的 1/10，而组分G 2 只有外层的1.3%。由电泳图（图 4）可见，心部总蛋白中没有GAFP。由以上结果可推论，GAFP在防止真菌侵染顶生球茎中起关键作用。

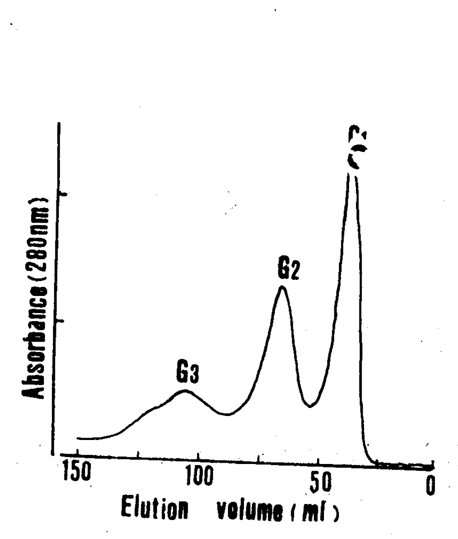


图 2　天麻球茎蛋白在葡聚糖凝胶G50上的过滤层析
Fig. 2　Gel filtration of the crude protein of *G. elata* corm on sephadex G50. The fraction G 2 was showed to be of antifungal activity.

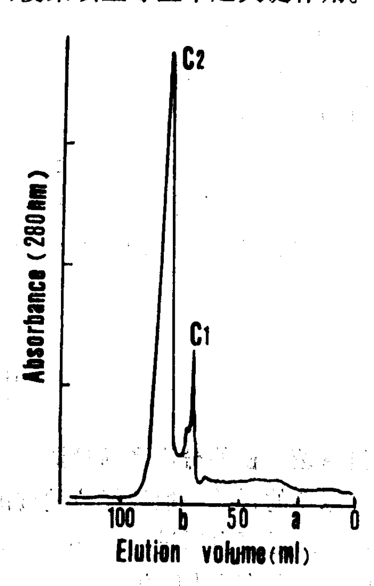


图 3　蛋白组分D_1在羧甲基纤维素上的离子交换层析
Fig. 3　Ion exchange chromatography of fraction D 1 on CM-cellulose. a. 0.02 mol/l phosphate buffer (pH 6.5), b. 0—0.02 mol/l NaCl for gradient elution. Fraction C2 possesed antifungal activity.

2.抗真菌蛋白的特性

SDS－PAGE（图 4）结果可计算得GAFP分子量为14.0 kD。这与凝胶过滤层析结果一致，GAFP 的洗脱体积位于chymotrypsin A（25 kD）和mabinlin A（12.4 kD）之间而靠近后者（图略）。由表 2 氨基酸组成分析结果推算的分子量接近13 kD。以上结果表明GAFP是单链蛋白。

GAFP是碱性蛋白，等电点8.1（图 5）。在纯化过程中，它通过阴离子交换柱（pH 6.5），而被阳离子交换剂所结合（pH 6.5）。

由表 2，GAFP富含天冬酰胺（25 mol/mol 蛋白），甘氨酸（10），丙氨酸

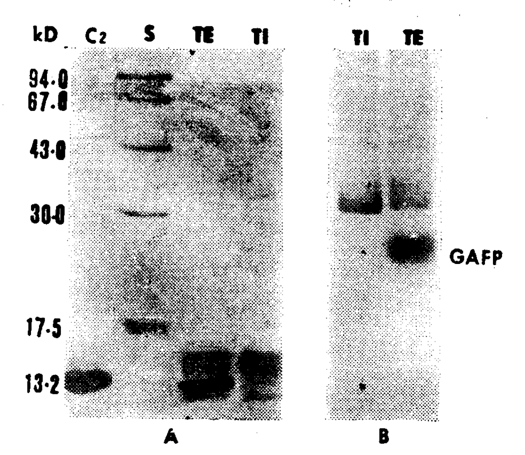


图 4　天麻球茎蛋白的SDS-PAGE图谱（A）和PAGE图谱（B）
Fig. 4　Patterns of SDS-PAGE (panel A) and PAGE (panel B) of proteins from *G. elata* corm. TE and TI mean totaal soluble proteins of external part and inner part of a corm respectively. C2 = GAFP, S, standard molecular weight proteins.

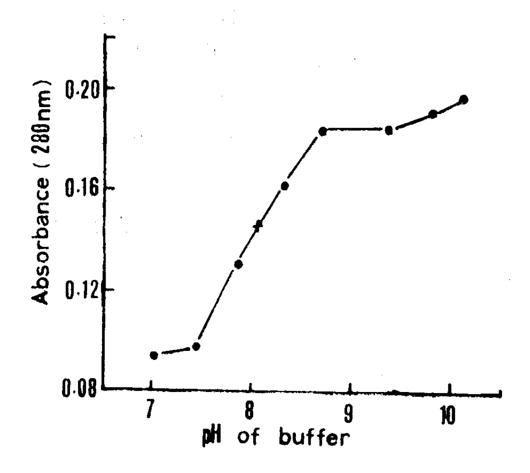


图 5　用离子交换结合法测定天麻抗真菌蛋白的等电点

Fig. 5　Binding of the antifungal protein from *G. elata* corm on SP-sephadex C50 depends on the pH of medium. After binding, the absorbance of supernatant was determined. The isoelectric point of the protein was calculated to be 8.1(+).

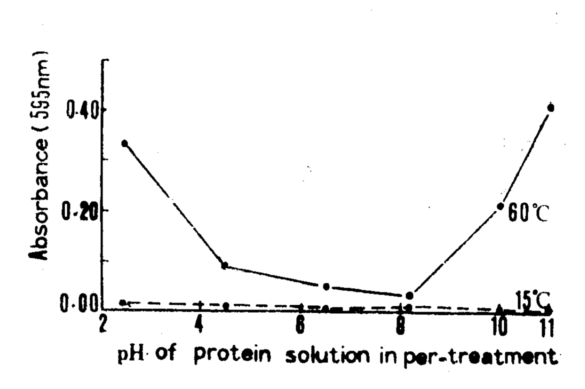


图 6　天麻抗真菌蛋白与考马氏亮蓝的显色反应依赖于蛋白的预处理

Fig. 6　Colour reaction of the antifungal protein with Coomassie blue reagent depends on the pretreatments of the protein. The protein solution at 1 mg/ml in 0.05 mol/l buffers with different pH were incubated at 15℃ and 60℃ respectively for 1 h; then 0.05 ml of treated protein solution was taken for color reaction with 2.5 ml reagent, absorbance was recorded.

(10) 和亮氨酸 (12)，但未检出含蛋氨酸、脯氨酸和半胱氨酸。该蛋白中酪氨酸 (5) 和色氨酸 (3) 较多，紫外吸收 $\lambda_M = 278$ nm，克分子消光值较大，为21600，紫外光谱见图 7。

在天然状态下，GAFP 与考马氏蓝试剂不发生显色反应（图 6），具这一性质的蛋白质文献中未见报道过。因此，考马氏蓝显色反应不能用来定量GAFP。由图 6，GAFP 在广宽 pH 范围内，经60°C处理 1 h，大部分发生变性，形成沉淀。在极端酸或碱性条件下，沉淀溶解，溶解的变性蛋白可与考马氏蓝染料发生显色反应。这一特性为研究GAFP 的立体结构及为研究蛋白质与考马氏蓝显色反应的机理提供便利条件。

3. GAFP抗菌作用的可能机理

由表 3 测定结果，天麻球茎粗蛋

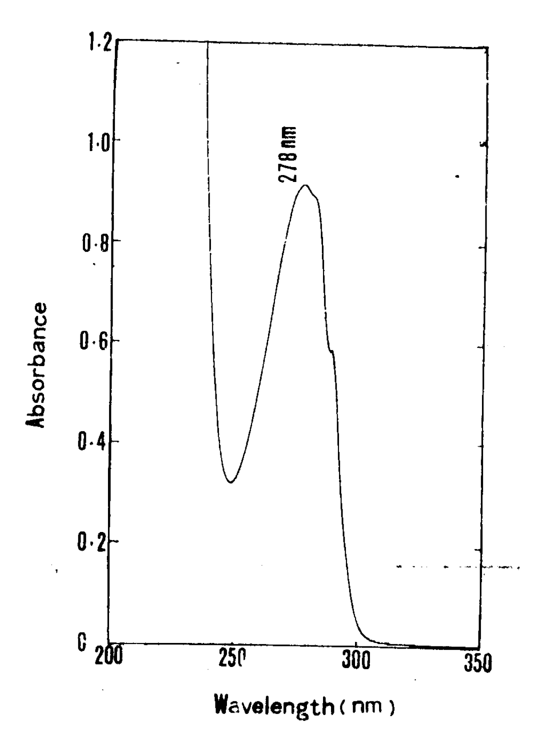


图 7　天麻抗真菌蛋白的紫外光谱

Fig. 7　UV spectrum of the antifungal protein from *G. elata*. $E^{1\%}_{238nm}$ of its aqueous solution at pH 7 is 16, ε = 21600.

白有较弱的几丁质酶和β-1,3-葡聚糖酶活性，但 GAFP 完全没有这二种酶的活性。Boller等人[12, 13]展示并强调了这二种酶在许多植物对真菌诱导抗性建立中起重要作用。GAFP则不属于这类消化真菌细胞壁的酶。

Roberts等人在大麦中分离到一种抗真菌蛋白，证明它是核糖体灭活蛋白(Ribosome Inactivating Protein, RIP)[2]，分子量 28 kD。这类蛋白在对真菌的抗性中所起作用也日益受重视。迄今报道的RIP的分子量均在 25 kD 以上[14]。显然，GAFP 是否属于RIP类型，或是一种新类型的抗真菌蛋白，值得进一步研究。

表1 天麻球茎各蛋白组分的产率及球茎皮部和心部蛋白组分产率的比较

Table 1 Comparison of protein fractions between external part and inner part of *G. elata* corm, and the yields of protein fractions in isolation procedure

Protein fractions	Corm part[1)]	Yield (mg)	antifungal activity
Precipitated with $(NH_4)_2SO_4$			
T	E	148	+
	I	14	−
Sephadex G50			
G1	E	50.6	weak
	I	3.3	weak
G2	E	60.5	+
	I	0.8	−
Deae-Sephadex			
D1	E	43.4	+
D2	E	7.8	−
CM-cellulose			
C1	E	3.1	−
C2	E	22.4	+

1) One kg of fresh corm was divided into external part(E) and inner part(I) equally in weight.

表3 天麻球茎蛋白几丁质酶和β-1,3-葡聚糖酶活性的测定

Table 3 Exochitinase and β-1,3-glucanase activities of *G. elata* corm proteins

Protein fraction	Exochitinase (unit)[1)]	β-1,3-glucanase (unit)[2)]
T	0.110	0.012
C2	0	0

1) One unit of chitinnase = 1 μg of N-acetylglucosamine produced by 1 mg of protein in one hour at 37℃

2) One unit of β-1,3-glucanase = 1 μg of glucose produced by 1 mg of protein in one hour at 40℃

表 2　天麻球茎抗真菌蛋白的氨基酸组成分析

Table 2　The amino acid composition of the antifungal protein from *Gastrodia elata* corm

Amino acids	Analysis data of protein sample 1)			Calculated data 2)
	μg x10	nmole	%	mole/mole of protein
Asp	26.21	20.79	17.47	24.90 (25)
Thr	5.86	4.93	3.91	5.92 (6)
Ser	8.09	7.70	5.39	9.24 (9)
Glu	9.57	6.52	6.38	7.82 (8)
Pro	0	0	0	0 (0)
Gly	6.74	8.99	4.49	10.44 (10)
Ala	7.61	8.56	5.07	10.23 (10)
Cys	0.27	0.12	0.18	0.14 (0)
Val	7.37	6.30	4.91	7.20 (7)
Met	0.10	0.07	0.07	0.08 (0)
Ile	7.45	5.68	4.97	6.83 (7)
Leu	12.58	9.59	8.39	11.51 (12)
Tyr	8.17	4.51	5.45	5.41 (5)
Phe	1.37	0.83	0.91	1.00 (1)
Lys	3.03	2.08	2.02	2.83 (3)
NH_3	6.49	38.14	–	–
His	2.05	1.32	1.37	1.58 (2)
Arg	9.04	5.20	6.03	6.24 (6)
Trp	5.01	2.80	3.34	3.36 (3)
Total			80.25	114

1) Protein sample was 15μg.

2) Calculated on a basis of one residue of Phe.

参考文献

1　周铉等. 天麻形态学. 北京：科学出版社，1987：76—94

2　Roberts W K, Selitrennikoff C P. *Biochem Biophys Acta* 1986; **880**: 161—170

3　Laemmli U K. *Nature* 1970; **227**: 680—685

4　Reisfeld R A, Lewis U J, Williams D E. *Nature* 1962; **195**: 281—283

5　Yang V C, Langer R. *Anal Biochem* 1985; **147**: 148—152

6　Goodwin T W, Morton R A. *Biochem J* 1946; **40**: 628

7　Bradford M M. *Anal Biochem* 1976; **72**: 248

8　Lingappa Y, Lockwood J L. *Phytopath* 1962; **52**: 317—323

9　Abeles F B, Bosshart R P, Forrence L E. *Plant Physiol* 1970; **47**: 129—134

10　Boucaud J, Bigot J, Dovaux J. *J Plant Physiol* 1987; 128: 337—349

11　Somogyi M. *J Biol Chem* 1952; **195**: 19—23

12　Schlumbaum A, Mauch F, Vogeli U, Boller T *Nature* 1986; **324**: 365—367

13 Boller T. Hydrolytic Enzymes in Plant Disease Resistance. in: Plant-Microbe Interactions, Molecular and Genetic perspectives, Vol 2. Kosuge T, Nester E W eds, New York: Macillan, 1987: 385—414
14 Stirpe F, Barbieri L. *FEBS Lett*, 1986, 195: 1—8

ISOLATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF AN ANTIFUNGAL PROTEIN FROM GASTRODIA ELATA CORM

Hu Zhong, Yang Zengming

(*Kunming Institute of Botany, Academia Sinica, Kunming*)

Wang Jun

(*Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica, Shanghai*)

Abstract An anti-fungal protein named GAFP was isolated and purified from the terminal corm of *Gastrodia elata* Bl. 4 μg of this protein impregnated in a paper disc on potato glucose agar medium inhibited obviously mycelial spread of *Trichoderma reessei*. About 20 mg of GAFP was obtained from 1 kg of fresh corm. Only the external part of corm contains this protein, whereas no GAFP was detected in inner part of corm. SDS-PAGE and gel filtration on sephadex G50 showed that GAFP is a single polypetide with MW = 14.0 kD, and pI = 8.1, determined by binding test of the protein on SP-Sephadex C50. The protein is rich in Asn, Gly, Ala and Leu, but lacks Met, Pro and Cys. GAFP can not give colour reaction with Coomassie blue reagent except that the protein is denatured by heat or SDS treatment. It was shown not to be of exochitinase and β-1,3- glucanase activity. GAFP is thought to play an important role in the defense mechanism of the yearly terminal corm to prevent the infection of fungi.

Key words *Gastrodia elata*; Anti-fungal protein